




## Flavonoide esters and their use notably in cosmetics

**Patent number:** FR2778663  
**Publication date:** 1999-11-19  
**Inventor:** BRESSON RIVAL DELPHINE; MARIOTTE ANNE  
MARIE; BOUMENDJEL AHCENE; PERRIER ERIC  
**Applicant:** COLETICA (FR)  
**Classification:**  
- **international:** C07D311/32; C07D311/30; A61K7/48  
- **european:** C07D311/30; C07D311/32; C07H17/07  
**Application number:** FR19980006194 19980515  
**Priority number(s):** FR19980006194 19980515

**Also published as:**

 US6235294 (B1)  
 JP2000026263 (A)  
 DE19922287 (A1)

**Report a data error here**

Abstract not available for FR2778663

Abstract of corresponding document: **US6235294**

The invention relates to a flavonoid ester. This flavonoid ester results from the reaction product of at least one flavonoid selected from the group consisting of a flavonoid with a ketone group in the 4-position, a salt, ester or ether of such a flavonoid, and a C-heteroside and/or O-heteroside derivative of such a flavonoid, with the proviso that this flavonoid contains at least one free alcohol group, with an organic monoacid having from 3 to 30 carbon atoms. These flavonoid esters constitute useful active principles for the manufacture of cosmetic, dermopharmaceutical, pharmaceutical, dietetic or agri-foodstuff compositions.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**This Page Blank (uspto)**

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 778 663

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

98 06194

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 07 D 311/32, C 07 D 311/30, A 61 K 7/48

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 15.05.98.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 19.11.99 Bulletin 99/46.

⑥① Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COLETICA Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : BRESSON RIVAL DELPHINE,  
MARIOTTE ANNE MARIE, BOUMENDJEL AHCENE et  
PERRIER ERIC.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

①④ NOUVEAUX ESTERS DE FLAVONOÏDES, LEUR UTILISATION EN COSMÉTIQUE, DERMOPHARMACIE, EN  
PHARMACIE ET EN AGRO-ALIMENTAIRE.

①⑤ L'invention concerne un ester de flavonoïde.

Cet ester est caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ester de  
flavonoïde résultant du produit de réaction d'au moins un  
flavonoïde choisi parmi le groupe consistant d'un flavonoïde  
ayant une fonction cétone en position 4, d'un sel, ester ou  
ether d'un tel flavonoïde, ou d'un dérivé C-hérérosides et/  
ou O-hétérosides d'un tel flavonoïde, à condition que ce fla-  
vonoïde comprenne au moins une fonction alcool libre, avec  
un monoacide organique ayant de 3 à 30 atomes de carbo-  
ne.

Ces esters de flavonoïdes constituent des principes ac-  
tifs utiles pour la fabrication de compositions cosmétiques,  
dermo-pharmaceutiques, pharmaceutiques, diététiques ou  
agro-alimentaires.

FR 2 778 663 - A1



L'invention concerne essentiellement de nouveaux esters de flavonoïdes, leur utilisation en cosmétique, dermo-pharmacie, pharmacie, diététique et agro-alimentaire, ainsi que des compositions cosmétiques, dermo-pharmaceutiques, pharmaceutiques, diététiques et agro-alimentaires en comportant application.

5 Dans le cadre de l'invention, il a été découvert de manière surprenante et inattendue que des esters particuliers de flavonoïdes pouvaient être stabilisés tout en conservant leur propriété initiale, en particulier anti-radicalaire et inhibiteurs d'enzymes, et pour les applications associées à ces propriétés :

- veinotonoque, augmentation de la résistance des capillaires sanguins,  
10 anti-couperose, inhibiteurs d'érythèmes chimiques, physiques ou actiniques, peaux sensibles, décongestionnant, drainant, amincissant, antirides, stimulateurs de la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire, tonifiant, rendant la peau plus élastique, anti-âge.

15 Etat de l'art antérieur :

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. C'est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, certains flavonols), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Ils peuvent également contribuer à la  
20 coloration par leur rôle de co-pigments : ainsi les flavones et les flavonols incolores co-pigmentent et protègent les anthocyanosides.

Les flavonoïdes absorbent dans l'UV et leur présence universelle dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, leur permet de protéger les tissus végétaux contre les effets nocifs du rayonnement UV.

25 Les environs 3000 flavonoïdes connus ont une origine biosynthétique commune et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central : on distingue ainsi les anthocyanes, les 2-phénylchromones (flavones, flavonols et leurs dimères ;  
30 flavanones et dihydroflavonols), les 3-phénylchromanes (isoflavones et

isoflavanones...), les 2-phénylchromanes (flavanes, flavan-3-ols, flavan-3,4-diols), les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones.

Ces flavonoïdes peuvent être glycosylés ; ils sont alors appelés hétérosides. La partie osidique peut être mono-, di- ou trisaccharidique. Les monosides sont  
5 formés avec le D-glucose, mais aussi avec le D-galactose ou le D-allose, avec des pentoses (D-apiose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose) ou avec les acides D-glucuronique et D-galacturonique. La variabilité structurale augmente avec les hétérosides dont la partie osidique est un disaccharide ou un trisaccharide qui peut être linéaire ou ramifié.

10 Deux types d'hétérosides ont été décrits, les O-glycosides et les C-glycosides. Pour les O-glycosides, la liaison entre la génine et l'ose peut se faire par l'un quelconque des hydroxyles phénoliques de la génine mais en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui sont impliqués. Pour les C-glycosides, la liaison s'établit entre le  
15 carbone anomérique du sucre et le carbone en 6 ou en 8 de la génine.

### **Les propriétés biologiques connues des flavonoïdes**

Potentiellement veino-actifs, les flavonoïdes diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance. Cette propriété "vitaminique P"  
20 est liée historiquement à l'observation que certaines manifestations du scorbut, guéries par l'administration de jus de citron, ne le sont pas par l'administration de la vitamine C seule. Il a donc été postulé que l'acide ascorbique ne pouvait agir qu'en association avec un facteur "P", identifié aux flavonoïdes. Souvent anti-inflammatoires (apigénol, chrysine, taxifoline, 8-glycosyl-hypolaetine,  
25 gossypine...), les flavonoïdes peuvent être anti-allergiques, hépatoprotecteurs (isobutrine, hispiduline, flavanolignanes....), antispasmodiques (flavonoïdes du thym....), hypocholestéromiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux et cytostatiques.

Ils agissent sur la régénération de l'acide ascorbique *in vivo via* le glutathion. Plus généralement, les flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres formés dans diverses circonstances :

- anoxie, qui bloque le flux d'électrons en amont des cytochromes oxydases et engendre la production de l'anion radical superoxyde ;
- inflammation, qui correspond, entre autres, à la production d'anions superoxydes par la NADPH-oxydase membranaire des leucocytes, mais aussi à celle (par dismutation et en présence d'ions ferreux) du radical hydroxyle et d'autres espèces réactives normalement mises en jeu au cours du phénomène de la phagocytose ;
- autoxydation lipidique, en général amorcée par un radical hydroxyle et qui produit - *via* les hydroperoxydes - des radicaux alkoxyde lipophiles.

De nombreux flavonoïdes réagissent avec les radicaux libres, empêchant ainsi les dégradations liées à leur intense réactivité au niveau des phospholipides membranaires.

15

#### **Flavonoïdes : inhibiteurs enzymatiques**

En règle générale, les flavonoïdes sont *in vitro* des inhibiteurs enzymatiques :

- inhibition de l'histidine décarboxylase ;
- inhibition des protéines kinases ;
- inhibition de l'élastase ;
- inhibition de la hyaluronidase, ce qui permettrait de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire ;
- inhibition non spécifique de la catéchol-*O*-méthyltransférase, ce qui augmenterait la quantité de catécholamines disponible et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire ;
- inhibition de la phosphodiesterase de l'AMPc ce qui pourrait expliquer, entre autres, leur activité anti-agrégante plaquettaire ;
- inhibition de l'aldose réductase ;

25

- plusieurs flavonoïdes, flavonols monomères et biflavonoïdes, sont de puissants inhibiteurs de la lipoxygénase et/ou de la cyclo-oxygénase, ce qui pour de nombreux auteurs - et au moins pour ce qui concerne l'inhibition de la cyclo-oxygénase - est en relation directe avec leur capacité à piéger les radicaux libres.
- 5 Ces propriétés démontrées *in vitro* pourraient expliquer, dans la plupart des cas, les activités anti-inflammatoires et anti-allergiques reconnues par de nombreux auteurs à plusieurs drogues connues pour renfermer des flavonoïdes .

Cependant un certain nombre de problèmes majeurs ne permettent pas d'utiliser les flavonoïdes dans un grand nombre d'applications cosmétiques ou pharmaceutiques, diététiques voire agro-alimentaires :

10

- La mise en solution des flavonoïdes et des hétérosides est extrêmement difficile : ainsi par exemple, les hétérosides sont plutôt hydrosolubles mais cette solubilité est très faible (rutoside, hespéridoside...). Les génines sont plutôt solubles dans les solvants organiques apolaires mais ici encore, cette solubilité est généralement très faible. Ces problèmes de solubilité peuvent parfois être résolus par l'utilisation d'excipients extrêmement sophistiqués, qui ne répondent néanmoins pas à une large utilisation des flavonoïdes,
- 15
- Ces flavonoïdes peuvent être colorés ou non, mais dans tous les cas, leur caractère antioxydant et leur très grande réactivité vis-à-vis de l'oxygène ou de la lumière les rend particulièrement instables, et des préparations, solutions, gels ou émulsions, qui en contiennent se colorent au cours du temps de façon spectaculaire (émulsions blanches qui deviennent marron au cours du temps).
- 20
- La concentration de ces molécules dans les extraits de plantes est en général faible et les activités énoncées ne sont pas systématiquement retrouvées dans les extraits végétaux.
- 25

Il a été proposé diverses solutions pour tenter de stabiliser les flavonoïdes.

Par exemple, le document WO95/21018 CNRS a décrit la préparation de microcapsules ayant des parois réticulées de polyphénols de plantes, en vue de stabiliser les polyphénols, les polyphénols stabilisés par la réticulation préservant leur activité initiale.

30

D'autre part, il est aussi décrit dans le document WO94/29404 des compositions de dérivés de polyphénols constituées par des dérivés de flavane et spécialement de flavan-3-ol, pour les stabiliser. En pratique, ce document vise essentiellement à utiliser des oligomères flavanoliques ou encore oligomères procyanolidiques, dénommés en abrégé OPC, sous forme de dérivés stabilisés.

Tous ces flavanes ou flavanols sont non-substitués en position 4 de l'hétérocycle flavanoïde.

#### **Buts de l'invention :**

Comme il est déjà décrit dans les documents antérieurs ci-dessus énoncés, c'est-à-dire WO95/21018 et WO94/29404, les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui présentent des propriétés antioxydantes intéressantes. L'utilisation de ces composés se heurte au problème de leur instabilité due à la présence de ces groupements phénoliques libres qui s'oxydent facilement au contact de l'oxygène ou de la lumière pour donner des composés de condensation radicalaire responsables de l'apparition de coloration qui rend leur utilisation impropre pour une application cosmétique.

La présente invention a pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution qui permette d'utiliser un groupe particulier de flavonoïdes, à savoir les flavonoïdes ayant une fonction cétone en position 4, aussi appelés les phényl chromones ou 3 pyrones, sous une forme suffisamment stable pour être utilisable en particulier dans le domaine cosmétique, dermo-pharmaceutique, pharmaceutique, diététique et agro-alimentaire, tout en conservant les propriétés initiales de ces flavonoïdes.

L'invention a également pour but de fournir une solution qui permet d'utiliser les flavonoïdes ayant une fonction cétone en position 4, ainsi que leurs sels, esters ou éthers, ou dérivés osidiques comportant au moins une ou plusieurs liaisons C-hétéroside et/ou O-hétéroside sous des formes stabilisées, pour être utilisées notamment dans des compositions cosmétiques, dermo-pharmaceutiques,



pharmaceutiques, diététiques ou agro-alimentaires, sans perdre les propriétés initiales de ces composés.

L'invention a encore pour but non seulement de stabiliser lesdits flavonoïdes, ainsi que leur dérivés précités mais aussi de fournir une forme lipophile conférant à ces composés des propriétés liposolubles, et en leur conférant aussi notamment une affinité plus grande avec la membrane cellulaire et notamment les couches cutanées.

Tous ces objectifs sont atteints pour la première fois par la présente invention d'une manière simple, fiable et reproductible, utilisable à l'échelle industrielle, cosmétique, pharmaceutique, diététique ou agro-alimentaire.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention fournit des esters de flavonoïdes, caractérisés en ce qu'il s'agit des esters de flavonoïdes résultant du produit de réaction d'au moins un flavonoïde choisi parmi le groupe consistant d'un flavonoïde ayant une fonction cétone en position 4, d'un sel, ester ou éther d'un tel flavonoïde, d'un tel flavonoïde comportant au moins une ou plusieurs liaisons C-hétéroside et/ou O-hétéroside, à condition que ce flavonoïde comprenne au moins une fonction alcool libre, avec un monoacide organique ayant de 3 à 30 atomes de carbone. Ce monoacide peut présenter une chaîne linéaire, ramifiée ou cyclique, saturée ou insaturée.

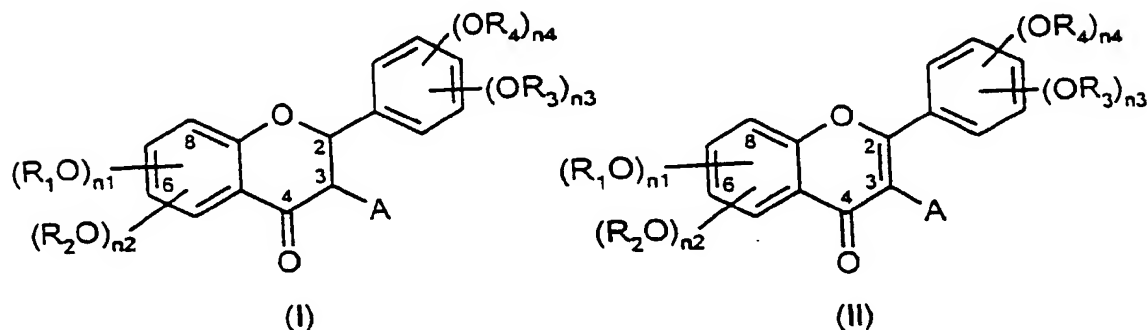
Le monoacide organique précité peut être naturellement choisi parmi tout monoacide organique à radical alkyle, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, ayant de 3 à 30 atomes de carbone, de préférence de 4 à 22 atomes de carbone.

Selon un mode avantageux de l'invention, le monoacide organique précité est choisi parmi le groupe consistant de l'acide butyrique (C4:0), de l'acide valérique (C5:0), de l'acide hexanoïque (C6:0), de l'acide sorbique (C6:2); de l'acide ascorbique, de l'acide laurique (C12:0), de l'acide palmitique (C16:0), de l'acide stéarique (C18:0), de l'acide oléique (C18:1), de l'acide linoléique (C18:2), de l'acide linolénique (C18:3); de l'acide undécylénique (C11:1), de l'acide heptanoïque (C7), de l'acide arachidonique (C20:4), de l'acide éicosa pentanoïque (C20:5), de l'acide docosahexanoïque (C22:6 et C24:1).

Selon encore un autre mode avantageux de l'invention, le flavonoïde précité ayant une fonction cétone en position 4 présente les formules chimiques développée (I) ou (II) suivantes :

5

10



15 dans lesquelles :

- les groupements  $(OR_1)$  à  $(OR_4)$  sont dans une position quelconque du cycle;

- A représente un atome d'hydrogène, un substituant R ou un groupe  $-OH$ , ou un groupe  $-OR$ , R ayant la même signification que les radicaux  $R_1$  à  $R_4$ ;

20 -  $n_1, n_2$  identiques ou différents l'un de l'autre, sont des nombres entiers de 0 à 4, le total de  $n_1 + n_2$  pouvant être au plus égal à 4, correspondant au nombre de substitutions maximum sur le cycle;

-  $n_3, n_4$  identiques ou différents l'un de l'autre, sont des nombres entiers de 0 à 5, le total de  $n_3 + n_4$  étant au maximum égal à 5, représentant le nombre de substitutions maximum sur le cycle;

25 -  $R_1, R_2, R_3$  et  $R_4$  représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène, un groupe alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, en particulier un groupe alkyle inférieur ayant de 1 à 6 atomes de carbone, linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé, un groupe acyle ayant un radical alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, de préférence de 1 à 8

atomes de carbone, linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé, un ose simple ou complexe comportant ou non des fonctions alkyles ou acyles avec des chaînes hydrocarbonées ayant de 1 à 30 atomes de carbone, linéaires ou ramifiés ou cycliques, saturées ou insaturées, à condition qu'au moins un des substituants R soit un atome d'hydrogène définissant ainsi au moins une fonction hydroxyle libre;

- et les isomères de ces motifs.

Selon encore un mode avantageux de l'invention, le flavonoïde précité de départ est une flavone en particulier de la formule (II) précitée, non-glycosylée, par exemple l'apigénol (ou apigénine) ou le lutéolol ou une flavone glycosylée, par exemple la diosmine, l'orientine, la saponarine, le shaftoside.

Selon encore un mode avantageux de l'invention, le flavonoïde de départ est un flavonol en particulier de la formule (II) précitée, non-glycosylé, par exemple le kaempférol, le quercétol (ou quercétine) ou un flavonol glycosylé, par exemple la rutine, le quercitroside, l'hypéroside, l'isoquercitroside, le tiliroside.

Selon encore un mode avantageux de l'invention, le flavonoïde de départ est un dihydroflavonol en particulier de la formule (II) précitée, non-glycosylé ou glycosylé, par exemple le dihydrokaempférol et le dihydroquercétol.

Selon encore un mode avantageux de l'invention, le flavonoïde de départ est une flavanone en particulier de la formule (I) précitée, non-glycosylée, par exemple le naringétol (ou naringénine) l'ériodictyol, l'hespéritine, l'eucalyptine, la cirsimaritrine, la cajaflavanone, l'hinokiklavone, l'amentaflavone, le bilobétol, ou une flavanone glycosylée, par exemple hespéridine et naringine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageuse de l'invention, l'ose ou oside substituant le flavonoïde précité est choisi parmi rhamnose, galactose, glucose, arabinose non substitué ou substitué, l'hétéroside étant de préférence choisi parmi tiliroside, orientine, shaftoside, saponarine, rutine, hespéridine, diosmine.

Les esters de flavonoïdes selon l'invention ont pu être préparés malgré la réactivité beaucoup plus faible des dérivés qui présentent une fonction cétone en

position 4, par rapport à ceux qui ne présentent pas cette fonction cétone, décrits dans l'art antérieur ; de plus les produits de l'invention présentent une stabilité particulièrement élevée, tout en maintenant leur propriété initiale, ce qui est tout à fait inattendu et non évident pour un homme de l'art.

5           En outre, les composés de l'invention présentent une activité lipophile qui leur confère un caractère liposoluble, ainsi que, notamment, une affinité pour les membranes cellulaires et en particulier les tissus de l'épiderme, ce qui est encore tout à fait surprenant..

          Selon un deuxième aspect, la présente invention couvre aussi l'utilisation  
10 des esters de flavonoïdes selon l'invention comme agent cosmétique, comme principe actif pour la fabrication de compositions cosmétiques, dermo-pharmaceutiques, de compositions pharmaceutiques, de compositions diététiques ou de compositions agro-alimentaires.

          Selon un troisième aspect, la présente invention couvre aussi  
15 unecomposition, notamment choisie parmi le groupe consistant d'une composition cosmétique, d'une composition dermo-pharmaceutique, d'une composition pharmaceutique, d'une composition diététique et d'une composition agro-alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend, comme l'un de ses agents actifs, au moins un ester de flavonoïde tel que précédemment défini. Ces compositions sont  
20 avantageusement des compositions anti-radicalaires, inhibitrices d'enzymes, et d'autre part, et notamment dans le cadre d'une application cosmétique, pharmaceutique, ou agro-alimentaire, ces compositions peuvent être utilisées, selon le cas et selon les personnes, pour réaliser un traitement veinotonique, d'augmentation de la résistance des capillaires sanguins, un effet anti-couperose, un  
25 effet inhibiteur d'érythèmes chimique, physique ou actinique, un traitement des peaux sensibles, un effet décongestionnant, un effet drainant, un effet amincissant, un effet antirides, un effet stimulateur de la synthèse des éléments de la matrice extra-cellulaire de l'épiderme, un effet tonifiant de l'épiderme, un effet d'amélioration de l'élasticité de la peau, un effet anti-âge de la peau.

Les compositions selon l'invention peuvent être appliquées par voie topique en utilisant avantageusement aussi un véhicule, excipient ou support approprié, en particulier cosmétiquement, dermo-pharmaceutiquement ou pharmaceutiquement acceptable, ou un véhicule, excipient ou support approprié pour une utilisation  
5 diététique ou agro-alimentaire.

De tels véhicules, excipients ou supports sont bien connus à l'homme de l'art et résultent aussi des exemples de formulation discutés plus loin. On pourra également se reporter aux excipients cités dans le document WO 95/21018, exemples 38-40 ou le document WO 94/29404, exemples 19-23 qui sont incorporés  
10 ici par référence.

Dans le cadre de l'invention, toutes les propriétés biologiques initiales des flavonoïdes étant préservées, l'ensemble des propriétés biologiques précédemment énoncées sont revendiquées comme faisant partie de la présente invention dans le cadre des esters de flavonoïdes de l'invention.

15 L'invention couvre encore un procédé de synthèse des esters de flavonoïdes précités caractérisé en ce qu'il comprend l'acylation d'au moins un flavonoïde choisi parmi le groupe consistant d'un flavonoïde ayant une fonction cétone en position 4, d'un sel, ester ou éther d'un tel flavonoïde, et d'un tel flavonoïde comportant au moins une ou plusieurs liaisons C-hétéroside et/ou O-hétéroside, avec un  
20 monoacide organique ayant de 3 à 30 atomes de carbone.

Les conditions de réalisation de telles acylations sont bien connues à l'homme de l'art ; elles peuvent être réalisées par voie chimique (solvants) ou enzymatique (lipase(s) en milieu anhydre).

Dans une autre réalisation de l'invention, cette acylation peut être réalisée  
25 sur une ou plusieurs ou même toutes les fonctions alcools du flavonoïde. Cette acylation peut être réalisée par diverses méthodes de synthèse chimiques bien connues à l'homme de l'art.

Une première méthode consiste à réaliser une réaction chimique permettant la substitution d'au moins un groupe -OH libre par un radical acyle de type -OCOR.

L'agent d'acylation peut être avantageusement choisi parmi les acides de formule  $\text{RCOOH}$ . Les dérivés de tels acides, en particulier les halogénures d'acide de formule  $\text{RCOHal}$ , les anhydrides de formule  $\text{RCOOCR}$  ou les esters de formule  $\text{RCOOR}'$ , R représentant par exemple un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ , et R' représentant de préférence un radical alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_6$ .

Lorsqu'on utilise de l'acide comme agent d'acylation, on peut réaliser la réaction en présence d'un agent d'activation de ce dernier qui peut être habituellement choisi parmi le dicyclohexylcarbodiimide ou le *tert*-butylchloroformiate qui permet de former un anhydride mixte.

La réaction d'acylation peut être réalisée classiquement en présence d'un solvant permettant une solubilisation partielle des composés polyphénoliques de départ.

Des solvants appropriés sont par exemple choisis parmi des solvants aromatiques tels que le toluène, une amine comme la pyridine, un dérivé halogéné tel que le chloroforme, un solvant oxygéné tel que l'acétone.

La réaction est réalisée de préférence à une température au moins égale à  $60^\circ\text{C}$ , ou de préférence à la température de reflux du solvant pendant une période de temps suffisante pour obtenir l'acylation.

Dans le cadre de l'invention, la réaction d'acylation est beaucoup plus difficile à obtenir que pour les flavanoïdes qui n'ont pas de substitution cétone en position 4 de l'hétérocycle, de sorte que l'homme de l'art ne s'attendait pas à pouvoir préparer de tels esters, qu'ils soient stables et qu'ils préservent l'activité initiale des flavonoïdes, sans dégradation de ces flavonoïdes, malgré les conditions de réaction défavorables.

Les flavonoïdes de départ sont dans le cadre de l'invention de préférence mis à réagir en étant solubilisés dans un solvant organique précité, tel que toluène, chloroforme, pyridine, acétone, l'agent acylant étant lui-même dissous dans cette phase organique.

On peut avantageusement utiliser des agents de transferts de phase qui permettent de faciliter la réaction comme des halogénures ou des hydroxydes

comme par exemple les halogéno sulfates par exemple le tetrabutylammonium, ou encore le chlorure de benzyltriéthylammonium. La réaction est réalisée en présence d'une base pour activer les fonctions hydroxy. Des bases sont choisies par exemple parmi des bases organiques telles que la pyridine, ou des bases inorganiques telles que carbonate de sodium ou de potassium en particulier sous forme de solution aqueuse saturée.

Il est ensuite aisé de recueillir le dérivé acylé obtenu constituant l'ester de flavonoïde selon l'invention du mélange réactionnel par décantation des phases et traitement de chacune des phases pour recueillir la totalité de l'ester de flavonoïde formé.

Dans le cadre de l'invention, on obtient généralement de très bons rendements qui peuvent être de l'ordre ou supérieur à 50%, sauf quelques exceptions lorsque l'on recherche à réaliser des dérivés monoacylés.

Les flavonoïdes de départ sont généralement des produits disponibles dans le commerce.

Cependant, l'extraction de ces substances peut être réalisée de manière connue par l'homme de l'art à partir de plantes. Il s'agit de préférence des fractions purifiées dont l'extraction des flavonoïdes ayant une fonction cétone en position 4 a été recherchée.

Dans le cadre de l'invention, les flavonoïdes comportant au moins une ou plusieurs liaisons C-hétéroside et/ou O-hétéroside sont avantageusement utilisés. Les oses sont par exemple rhamnose, galactose, glucose, arabinose non substitué ou substitué, l'hétéroside étant de préférence choisi parmi tiliroside, orientine, shaftoside, saponarine, rutine, hespéridine, diosmine, sans limitation.

Les esters de l'invention permettent de protéger efficacement les fonctions hydroxyle des flavonoïdes de départ tout en permettant de favoriser le transport de ces esters au travers des membranes biologiques.

Dans le cadre de l'invention, il a pu être découvert de manière totalement inattendue que les estérases présentes dans les tissus cellulaires, en particulier dans l'épiderme, sont capables de couper une ou plusieurs fonctions ester ainsi formées

dans les esters de flavonoïdes de l'invention et de régénérer les flavonoïdes de départ ainsi que le monoacide organique utilisé.

De ce fait, l'invention permet d'utiliser en combinaison les flavonoïdes ainsi libérés ayant leur(s) propre(s) activité(s) qui ont été préservées, ainsi que les  
5 monoacides organiques qui peuvent ainsi agir d'une manière synergique.

Dans la mesure où ce monoacide organique présente une activité propre comme par exemple l'acide sorbique ou l'acide ascorbique, l'invention permet de combiner l'activité de cet acide avec l'activité du flavonoïde.

Les esters de flavonoïdes selon l'invention peuvent être utilisés comme agent  
10 cosmétique.

Dans ce cadre, les esters de flavonoïdes selon l'invention sont généralement mélangés avec un excipient, véhicule ou support cosmétiquement acceptable. Une quantité efficace pour une activité cosmétique des esters de flavonoïdes selon l'invention est généralement comprise entre 0,0001% et 10% en poids, de  
15 préférence entre 0,01 et 5% en poids par rapport au poids final de la composition cosmétique. L'activité cosmétique avantageuse des esters de flavonoïdes selon l'invention réside dans une activité anti-radicalaire, une activité anti-oxydante, une activité anti-couperose, un effet inhibiteur d'érythèmes chimiques, physiques ou actiniques, un traitement des peaux sensibles, un traitement drainant, un traitement  
20 amincissant, à un traitement antirides, un effet stimulateurs de la synthèse des éléments de la matrice extra-cellulaire, en particulier de l'élastine, un effet tonifiant, un effet d'amélioration de l'élasticité de la peau ou de l'épiderme, un effet anti-âge.

Grâce à la propriété liposoluble des esters de flavonoïdes selon l'invention, ces esters de flavonoïdes peuvent être aisément incorporés dans des formulations  
25 cosmétiques classiques, notamment sous forme de crèmes, pommades, émulsions, gel ou lotions. Les esters de flavonoïdes peuvent être utilisés à l'état libre, ou à l'état encapsulé, en particulier en étant au moins en partie incorporés dans de liposomes.

Selon l'invention, les esters de flavonoïdes précités peuvent être aussi utilisés en diététique ou dans des compositions agro-alimentaires.



Les esters de flavonoïdes selon l'invention permettent d'assurer une meilleure stabilité des aliments grâce à leur activité antiradicalaire et antioxydante. Comme compositions agro-alimentaires, on peut citer des boissons, des jus de fruits, des boissons toniques, des produits laitiers.

5 L'invention permet aussi de préparer des compositions pharmaceutiques.

Dans ce cadre, la posologie utilisée est celle qui est habituellement prévue pour les flavonoïdes pour leurs activités connues.

Dans le cadre d'une application sur l'épiderme, on préférera utiliser des compositions pharmaceutiques topiques, dans lesquelles les esters de flavonoïdes selon l'invention seront mélangés à un excipient pharmaceutiquement acceptable compatible avec l'épiderme. Ces compositions pharmaceutiques peuvent ainsi être formulées pour avoir un effet veinotonique, par exemple sous forme de pommade, pour augmenter la résistance des capillaires sanguins, pour obtenir un effet anti-couperose, un effet inhibiteur d'érythèmes chimiques, physiques ou actiniques.

15 L'invention concerne aussi un procédé de traitement cosmétique ou pharmaceutique, caractérisé en ce qu'il comprend l'application à tout mammifère, de préférence un être humain en ayant besoin, d'une quantité cosmétiquement ou thérapeutiquement efficace d'au moins un ester de flavonoïde précité, en particulier par voie topique.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, on réalise un traitement cosmétique.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, en réalisant un traitement thérapeutique.

D'autre buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière des exemples de réalisation suivants donnés à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention.

25 Dans les exemples, tous les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire, la température est donnée en °C ou est la température ambiante, la pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire.

Les produits les plus testés sont l'hespératine, la quercétine et l'hesperidine, lipophilisés par l'acide palmitique (C16), l'acide laurique (C12) et l'acide butyrique (C4).

5    **Exemple 1 : Quercétine (famille des flavonols) pentaacylée par C12**

Dans un ballon sec de 1 l on place 5 g de flavonoïde (16,55 mmoles) et on ajoute 200 ml de toluène. Le chlorure d'acide laurique (165,5 mmoles) puis une solution saturée de  $K_2CO_3$  sont ajoutés. La solution est portée à reflux pendant 1 h. La phase du toluène est séparée et la phase aqueuse est extraite par le chloroforme.

10   Les deux phases toluène et chloroforme sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl puis séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Le brut obtenu (13 g) est purifié sur gel de silice (700 g) élué par chloroforme/hexane 50/50 puis chloroforme. Les fractions contenant le produit sont combinées, concentrées et séchées sur pompe à vide pendant 24 h pour obtenir 10,83 g de quercétine

15   pentaacylée par C12 (poudre jaune). Rendement 54 %.

**Exemple 2 : Quercétine pentaacylée par C12**

A 5 g de quercétine (16,55 mmoles) dans 100 ml de pyridine est ajoutée 165,5 mmoles de chlorure d'acide laurique. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 6

20   heures. La solution est concentrée sous vide et le brut est dissout dans 200 ml de dichlorométhane. Après lavages avec des solutions aqueuses de  $CuSO_4$ , puis de NaCl, la solution est séchée sur  $Na_2SO_4$  puis concentrée. Le brut (16 g) est purifié sur colonne de silice (800 g) élué par le dichlorométhane/hexane (2:3) pour obtenir 12,23 g de quercétine pentaacylée par C12. Rendement : 61 %.

25

**Exemple 3 : Quercétine pentaacylée par C16**

Dans un ballon sec de 1 l on place 5 g de flavonoïde (16,55 mmoles) et on ajoute 200 ml de toluène. Le chlorure d'acide palmitique (165,5 mmoles) puis une solution saturée de  $K_2CO_3$  (100 ml) sont ajoutés. La solution est portée à reflux

30   pendant 1 h. La phase du toluène est séparée et la phase aqueuse est extraite par le

chloroforme. Les deux phases toluène et chloroforme sont lavées par une solution aqueuse saturée de NaCl puis séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Le brut obtenu (19,3 g) est purifié sur gel de silice (500 g) élué par chloroforme/hexane 50/50 puis chloroforme. Les fractions contenant le produit  
5 sont combinées, concentrées et séchées sur pompe à vide pendant 24 h pour obtenir 12,84 de quercétine pentaacylée par C16 (poudre blanche).  
Rendement 52 %.

#### Exemple 4 : Quercétine pentaacylée par C16

10 A 5 g de quercétine (16,55 mmoles) dans 100 ml de pyridine est ajoutée 165,5 mmoles de chlorure d'acide palmitique. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 6 heures. La solution est concentrée sous vide et le brut est dissout dans 200 ml de dichlorométhane. Après lavages avec des solutions de CuSO<sub>4</sub>, puis de NaCl, la solution est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis concentrée. Le brut (17,6 g) est purifié sur  
15 colonne de silice (800 g) élué par le dichlorométhane/hexane (1:3) pour obtenir 14,3 g de quercétine pentaacylée par C16. Rendement : 58 %.

#### Exemple 5 : Quercétine pentaacylée par C4

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g de quercétine et 165,5 mmoles  
20 d'anhydride d'acide butyrique, le produit brut (8,34 g) est purifié sur colonne de silice (700 g) éluée par le CHCl<sub>3</sub>:hexane 2:3 pour obtenir 5,18 g de quercétine pentaacylée par C4 (rendement 48 %).

#### Exemple 6 : Hespéritine (famille des flavanones) diacylée par C12

25 Dans un ballon sec de 1 l on place 5 g de flavonoïde (16,55 mmoles) et on ajoute 200 ml de toluène. Le chlorure d'acide laurique (26,5 mmoles) puis une solution aqueuse saturée de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 ml) sont ajoutés. La solution est portée à reflux pendant 1 h. La phase du toluène est séparée et la phase aqueuse est extraite par le chloroforme. Les deux phases toluène et chloroforme sont lavées par une solution  
30 aqueuse saturée de NaCl puis séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Le

brut obtenu (10,8 g) est purifié sur gel de silice (500 g) élué par dichlorométhane/hexane 1/4 puis chloroforme. Les fractions contenant le produit sont combinées, concentrées et séchées sur pompe à vide pendant 24 h pour obtenir 7,1 g d'hespéritine diacylée par C12 (huile). Rendement 64 %.

5

#### Exemple 7 : Hespéritine monoacylée par C12

Dans un ballon sec de 1 l on place 5 g de flavonoïde (16,55 mmoles) et 70 mL de chloroforme. Le chlorure d'acide laurique (3,85 ml, 16,55 mmoles) puis la pyridine (1,88 ml, 16,55 mmoles) sont ajoutés puis la réaction est chauffée à reflux pendant 15 h. Après dilution avec 150 mL de chloroforme, la phase organique est séparée, lavée par une solution aqueuse de NaCl, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrée pour obtenir 11,28 g d'une huile rouge. La purification du produit brut sur colonne de silice (400 g) élué par le dichlorométhane donne 1,98 g d'hespéritine diacylée en C12 (rendement 18%) et 0,81 g d'hespéritine monoacylée en C12 (rendement 10%).

15

#### Exemple 8 : Hespéritine monoacylée par C12

Dans un ballon sec de 1 l on place 5 g de flavonoïde (16,55 mmoles) et 100 ml de pyridine puis 16,55 mmoles de chlorure d'acide laurique. La solution est agitée à température ordinaire pendant 1 heure et évaporée à sec. Le brut est dissout dans 200 ml de chloroforme, lavé par une solution de CuSO<sub>4</sub> puis par une solution aqueuse de NaCl, séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentré pour obtenir 8,92 g de produit brut qui est chromatographié sur colonne de silice (400 g) élué par le dichlorométhane pour obtenir 2,74 g d'hespéritine diacylée en C12 (rendement 25%) et 0,96 g d'hespéritine monoacylée en C12 (rendement 12%). Ces produits peuvent être utilisés sous la forme du produit brut, du produit purifié en mélange, ou sous la forme de produits purifiés de façon indépendante.

25

30

**Exemple 9 : Hespéritine mono- et di-acylée par C12**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 16,55 mmoles de chlorure d'acide laurique, le produit brut (8,92 g) n'est pas purifié ; il contient l'hespéritine monoacylée et diacylée en C12 (rendement 37%) et est utilisé tel  
5 quel.

**Exemple 10 : Hespéritine mono- et di-acylée par C16**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 16,55 mmoles de chlorure d'acide palmitique, le produit brut (10,3g) est purifié sur colonne de  
10 silice (600 g) élué par le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Hexane 1/1 et  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  permet d'obtenir 2,7 g d'hespéritine diacylée en C16 (rendement 21%) et 0,89 g d'hespéritine monoacylée en C16 (rendement 10%) qui peuvent être utilisés sous la forme du produit brut, du produit purifié en mélange, ou sous la forme de produits purifiés de façon indépendante.

15

**Exemple 11 : Hespéritine triacylée par C16**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles de chlorure d'acide palmitique, le produit brut est purifié sur colonne de silice (500 g) éluée par le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :Hexane 1:1 pour obtenir 10 g d'hespéritine triacylée par  
20 C16 (rendement 59,4 %).

**Exemple 12 : Hespéritine triacylée par C4**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles d'anhydride d'acide butyrique, le produit brut (13g) est purifié sur colonne de silice  
25 (700 g) éluée par le  $\text{CHCl}_3$ :hexane 2:3 pour obtenir 4,61 g d'hespéritine triacylée par C4 (rendement 55 %).

30

**Exemple 13 : Hespéritine triacylée par C18:0**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles de chlorure d'acide stéarique, le produit brut peut être utilisé tel quel ou purifié sur colonne de silice pour obtenir l'hespéritine triacylée par C18:0.

5

**Exemple 14 : Hespéritine triacylée par C18:1**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles de chlorure d'acide oléique, le produit brut peut être utilisé tel quel ou purifié sur colonne de silice pour obtenir l'hespéritine triacylée par C18:1.

10

**Exemple 15 : Hespéritine triacylée par C18:2**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles de chlorure d'acide linoléique, le produit brut peut être utilisé tel quel ou purifié sur colonne de silice pour obtenir l'hespéritine triacylée par C18:2.

15

**Exemple 16 : Hespéritine triacylée par C18:3**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles de chlorure d'acide linoléique, le produit brut peut être utilisé tel quel ou purifié sur colonne de silice pour obtenir l'hespéritine triacylée par C18:3.

20

**Exemple 17: Hespéritine triacylée par C11:1**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles de chlorure d'acide undécylénique, le produit brut peut être utilisé tel quel ou purifié sur colonne de silice pour obtenir l'hespéritine triacylée par C11:1.

25

**Exemple 18 : Hespéritine triacylée par C7**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles de chlorure d'acide heptanoïque, le produit brut peut être utilisé tel quel ou purifié sur colonne de silice pour obtenir l'hespéritine triacylée par C7.

30

**Exemple 19 : Hespéritine triacylée par l'acide succinique**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéritine et 99,3 mmoles d'anhydride d'acide succinique, le produit brut peut être utilisé tel quel ou purifié sur colonne de silice pour obtenir l'hespéritine triacylée par l'acide succinique.

5

**Exemple 20 : Ester acylé de l'apigénine de la famille des flavones**

Dans cet exemple, on précède comme décrit à l'exemple 6, si ce n'est que l'on utilise l'apigénine en lieu et place de l'hespéritine.

- 10 On obtient de l'apigénine triacylé. Il est à noter que l'apigénine est un composé de la formule (II) comportant 3 fonctions OH.

On peut réaliser des variantes de fabrication en utilisant des conditions réactionnelles différentes, ou en changeant la nature de l'acide utilisé, et  
15 conformément aux exemples 7 à 19.

**Exemple 21 : Ester acylé de la naringénine de la famille des flavanones, comme l'hespéritine**

- 20 On peut préparer un ester acylé de la naringénine en utilisant les conditions de réaction d'un quelconque des exemples 6 à 19, mais en remplaçant l'hespéritine par la naringénine.

On obtient un dérivé triacylé ?

25

**Exemple 22 : Hespéridine (famille des flavanones glycosylées) octaacylée par C12**

En suivant le protocole de l'exemple 2 avec 5g d'hespéridine et 131,02 mmoles de chlorure d'acide laurique, le produit brut (15 g) peut être purifié sur colonne de  
30 silice pour obtenir de l'hespéridine octaacylée par C12.

**Exemple 23 : Ester d'acide palmitique de l'hespéridine de la famille des flavanones glycosylées**

- 5 On procédant comme décrit à l'exemple 22 mais en utilisant le chlorure de l'acide palmitique en lieu et place du chlorure de l'acide laurique, on obtient l'ester palmitate du titre de cet exemple.

**Exemple 24 : Ester de flavonoïde de la naringine de la famille des flavanones glycosylées, comme l'hespéridine**

On prépare un ester acylé de naringine en utilisant les conditions de réaction de l'exemple 22 mais en utilisant la naringine en lieu et place de l'hespéridine.

**Exemple 25 : Ester acylé de la diosmine de la famille des flavones glycosylées**

On peut préparer un ester acylé de la diosmine, par exemple acylé avec l'acide laurique en utilisant les conditions réactionnelles de l'exemple 6 avec l'emploi de diosmine en lieu et place d'hespéridine.

20

**Exemple 26 : Ester acylé de la rutine de la famille des flavonols glycosylés**

On peut préparer un ester laurique de la rutine en utilisant les conditions réactionnelles de l'exemple 6.

25

Dans le cas des exemples 23 à 26, on peut aussi changer l'acide d'estérification, ou les conditions réactionnelles, selon les variantes de réalisation objet des exemples 7 à 19.



**Exemple 27 : Test de stabilité des flavonoïdes vis-à-vis de l'oxydation dans des préparations simples**

Une solution d'hésperitine à 31,1 g/l (soit 0.103M) est réalisée dans l'éthoxydiglycol. Le pH est ajusté à 5 ou 6 puis 10g/l d'un conservateur à base de parabènes est rajouté au mélange de façon à éviter la pollution bactérienne.

Par ailleurs, le produit de l'invention issu de l'exemple 9 est mis également en solution à 0,103M dans l'éthoxydiglycol, le pH est ajusté à 5 ou 6 puis 10g/l d'un conservateur à base de parabènes est également rajouté au mélange.

A concentration molaire identique, les deux produits sont donc comparés pour leur stabilité à l'oxydation, les paramètres de couleurs servant d'indicateurs de stabilité. Les références de couleur données dans les exemples qui suivent se réfèrent aux couleurs Pantones telles qu'utilisées dans tous les nuanciers de peintures bien connus par l'homme de l'art.

**TABLEAU I**

Couleur des solutions 1 jour après fabrication :

	Hésperitine			Hésperitine acylée selon l'exemple 9 de l'invention		
	20°C	4°C	45°C	20°C	4°C	45°C
pH5	157C orange à marron	157C orange à marron	157C orange à marron	1205C jaune très clair	120C	120C
pH6	157C orange à marron	157C orange à marron	157C orange à marron	1215C jaune clair	120C	113C

**TABLEAU II****Couleur des solutions 21 jour après fabrication :**

	Hespéritine			Hespéritine acylée selon l'exemple 9 de l'invention		
	20°C	4°C	45°C	20°C	4°C	45°C
pH5	noir + précipité	noir + précipité	noir + précipité	1205C Jaune très clair	1205C	120C
pH6	noir + précipité	noir + précipité	noir + précipité	1215C jaune clair	1205C	121C

- 5 La lipophilisation ici par acylation des flavonoïdes peut donc être un moyen pour stabiliser ces substances vi-à-vis de l'oxydation.

**Exemple 28 : Essai de stabilité des flavonoïdes vis-à-vis de l'oxydation dans des préparations complexes (émulsions)**

**5 Composition de la formulation :**

Phase	INCI Dénomination	g/100g
A	Eau	qsp100
B	PEG2 Stéarate SE, Cetareth 25 <sup>®</sup> , Huile de noix de coco hydrogénée, Huile minérale	16,0
C	Eau Polyacrylamide, Isoparaffine, Laureth-7 <sup>®</sup>	3,0 1,0
D	Phénoxyéthanol, Méthylparabène, Ethylparabène, Propylparabène, Butylparabène Butylène glycol	1,0 1,0
E	Ethoxydiglycol avec ou sans flavonoïde libre, avec ou sans Produit de l'invention	0,01-40

**TABLEAU III**

**Essai de stabilité :**

10

Crèmes	Témoin	Hespératine 520 µM	Produit de l'invention selon l'exemple 9 520 µM	Hespératine 1043 µM	Produit de l'invention selon l'exemple 9 1043 µM
pH	6,94	6,76	6,97	6,9	6,9

T 1 jour	Blanche	Beige clair	Blanche	Beige plus prononcé	Blanche
T 7 jours	Blanche	Jaune +++	Reflets jaunes très légers	Très jaune +++++	Reflets jaunes
T 25 jours	Blanche	Jaune +++	Reflets jaunes très légers	Très jaune +++++	Reflets jaunes
T 35 jours	Blanche	Jaune ++++	Reflets jaunes très légers	Très jaune +++++	Reflets jaunes

Après étude des stabilité sur 1 mois environ, on peut dire que les formulations contenant des flavonoïdes utilisés sous forme non lipophilisées voient leur couleur évoluer de façon extrêmement défavorable à 45°C.

5

La formulation dont la stabilité vis-à-vis de la couleur est la plus proche de celle du témoin, concerne la formulation contenant 520 µM de flavonoïde lipophilisé.

A molarités constantes, les crèmes contenant les flavonoïdes lipophilisés sont plus stables que celles contenant les flavonoïdes, phénomène accentué quand le  
10 flavonoïde est introduit en excès dans la crème.

La lipophilisation des flavonoides stabilise donc la couleur dans les émulsions.

#### Exemple 29 : Dosage de l'activité anti-élastase

15 Le substrat enzymatique élastine-rhodamine, est placé en solution en tampon TrisHCl (31,52 g de TrisHCl qsp 1000ml d'eau) à pH 8,8, à raison de 15mg/ml.  
1 mg d'élastase leucocytaire humaine est mis en solution dans 20 ml de tampon TrisHCl.

Les produits de l'invention sont évalués pour leur capacité à inhiber la dégradation  
20 de l'élastine, dégradation qu'il est possible de suivre par fluorescence (excitation à 530 nm ; émission à 590 nm) après incubation pendant 20 min., à 37°C d'un

mélange comprenant le substrat, l'enzyme et l'inhibiteur à tester. Les résultats sont donnés en % d'inhibition, par rapport au témoin sans inhibiteur.

Les produits de l'invention de l'exemple 7 et de l'exemple 9 ainsi que le flavonoïde non modifié sont solubilisés dans l'éthoxydiglycol :

5

TABLEAU IV

Essai anti-élastase

Concentration du test (mol/l)	Hespératine	Produit de l'invention (ex 7)	Produit de l'invention (ex 9)
0,103	100	100	100
$1,03^{-3}$	20	50	44
$1,03^{-4}$	24	36	38
$1,03^{-5}$	0	34	34

- 10 Les produits de l'invention de l'exemple 6 ainsi que le flavonoïde non modifié sont solubilisés dans l'éthoxydiglycol :

TABLEAU V

Essai anti-élastase

15

Concentration du test (mol/l)	Hespératine	Produit de l'invention (ex 6)
0,103	100	100
$1,03^{-3}$	20	65
$1,03^{-5}$	0	29

L'activité anti-élastase est plus forte pour les flavonoides lipophilisés que pour les flavonoïdes avant lipophilisation.

### Exemple 30 : Dosage de l'activité anti-radicalaire in vitro

Une solution à 60 $\mu$ M de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl dans l'éthanol est placée pendant 30 minutes à température ambiante en contact avec un échantillon issu des produits de l'invention, dont on veut déterminer le pouvoir anti-radicalaire. La chute l'absorbance est alors mesurée à 520nm et les résultats sont donnés en pourcentage de diminution de DO provoqué par le composé testé par rapport au solvant utilisé. Plus le pourcentage de diminution sera élevé, plus l'actif testé possédera une activité anti-radicalaire forte.

Les produits de l'invention sont mis en solution dans le DMSO ; les résultats (témoin DMSO déduit) sont donnés en % d'activité anti-radicalaire tel que décrit ci-dessus :

TABLEAU VI

Composé à 25 mM	Activité anti-radicalaire
Hespéritine	42%
Produit de l'exemple 6	67%

Les produits de l'invention sont mis en solution dans l'éthoxydiglycol ; les résultats (témoin éthoxydiglycol déduit) sont donnés en % d'activité anti-radicalaire tel que décrit ci-dessus :

TABLEAU VII

concentration en	Hespéritine	Produit de l'invention	Produit de l'invention
------------------	-------------	------------------------	------------------------

(mol/l)		selon l'exemple 8	selon l'exemple 9
0,103	94	93	95
1,03 <sup>-3</sup>	28	10	17
1,03 <sup>-5</sup>	8	6	12

L'activité anti-radicalaire est conservée après lipophilisation des flavonoides, ce qui est totalement inattendu par l'homme de l'art

5 **Exemple 31 : Utilisation des produits de l'invention dans des formulations cosmétiques ou pharmaceutiques de type émulsion huile dans eau**

**Formulation 31a**

A	. Eau	qsp 100
	. Butylène Glycol	2
	. Glycérine	3
	. Sodium Dihydroxycétyl Phosphate, Isopropyl Hydroxycétyl Ether	2
	. Butylène Glycol, Méthylparabène, Ethylparabène, Propylparabène,	2
	. Produits de l'invention	0,0001 - 5 %

10

B	. Glycol Stéarate SE	14
	. Triisononanoine	5
	. Cocoate d'octyle	6

**Formulation 31b**

	. Eau	qsp 100
	. Butylène Glycol	2

. Glycérine	3
. Polyacrylamide, Isoparafine Laureth-7®	2,8
. Butylène Glycol, Méthylparabène, 2 Ethylparabène, Propylparabène	
. Phénoxyéthanol, Méthylparabène, 2 Propylparabène, Butylparabène, Ethylparabène	
. Butylène Glycol	0,5
. Produits de l'invention	0,0001 - 5 %

### **Formulation 31c**

A	. Carbomer®	0,50
	. Propylène Glycol	3
	. Glycérol	5
	. Eau	qsp 100
B	. Cocoate d'octyle	5
	. Bisabolol	0,30
	. Diméthicone	0,30
C	. Hydroxyde de sodium	1,60
D	. Phénoxyéthanol, Méthylparabène, 0,50 Propylparabène, Butylparabène, Ethylparabène	
E	. Parfum	0,3
F	. Produits de l'invention	0,0001 - 5 %

5



**Exemple 32 de l'invention : Utilisation des produits de l'invention dans une formulation de type eau dans huile**

A	. PEG 30 - dipolyhydroxystéarate	3
	. Triglycérides Capriques	3
	. Octanoate de stéaryle	4
	. Adipate de dibutyle	3
	. Huile de grains de raisins	1,5
	. Huile de jojoba	1,5
	. Phénoxyéthanol, Méthylparabène,	0,5
	. Propylparabène, Butylparabène,	
	. Ethylparabène	
5		
B	. Glycérine	3
	. Butylène Glycol	3
	. Sulfate de magnésium	0,5
	. EDTA	0,05
	. Eau	qsp 100
C	. Cyclométhicone	1
	. Diméthicone	1
D	. Parfum	0,3
E	. Produit de l'invention	0,0001 - 5 %

10 **Exemple 33 de l'invention : Utilisation des produits de l'invention dans une formulation de type shampooing ou gel douche**

A	. Gomme de Xanthane	0,8
	. Eau	qsp 100
B	. Butylène Glycol, Méthylparabène, 0,5 Ethylparabène, Propylparabène	
	. Phénoxyéthanol, Méthylparabène, 0,5 Propylparabène, Butylparabène, Ethylparabène	
C	. Acide Citrique	0,8
D	. Sodium Lauryl Sulfate	40,0
E	. Produit de l'invention	0,0001 - 1 %

5

**Exemple 34 de l'invention : Utilisation des produits de l'invention dans une formulation de type rouge à lèvres et autres produits anhydres**

A	. Cire Minérale	17,0
	. Isostéaryl Isostéarate	31,5
	. Propylène Glycol Dipelargonate	2,6
	. Propylène Glycol Isostéarate	1,7
	. PEG 8 cire d'abeille	3,0
	. Huile de noyau de Palme et de Palmiste, Glycérade de palmier hydrogéné	3,4
	. Huile de Lanoline	3,4
	. Huile de Sesame	1,7
	. Tribéhénine	1,7
	. Lactate de Cétyle	1,7

	. Huile minérale, alcool de lanoline	3,0
B	. Huile de ricin	qsp 100
	. Dioxyde de Titane	3,9
	. Rouge Covonor W360A® (Wackherr) (CI 15850:1)	0,616
	. Bromo de Phloxine 27® (Wackherr) (CI 45410:1)	0,256
	. Rouge Covalac W 1501® (Wackherr) (CI 19140:1)	0,048
	. Oxydes de fer (CI 77491)	2,048
C	. Produit de l'invention	0,0001 - 5

5 **Exemple 35 de l'invention : Utilisation des produits de l'invention dans une formulation de gels aqueux (contours de l'oeil, amincissants, etc...)**

	. Eau	qsp 100
	. Carbomer®	0,5
	. Butylène Glycol	15
	. Phénoxyéthanol, Méthylparabène, 0,5	
	. Propylparabène, Butylparabène,	
	. Ethylparabène	
	. Produit de l'invention	0,0001 - 5

10 **Exemple 36 : Etudes toxicologiques réalisées avec le produit de l'invention de l'exemple 9**

Le produit de l'exemple 9 (6 g) est mis en solution dans l'éthoxydiglycol (93 g) et 1 g d'un mélange contenant différents parabènes utilisés en tant qu'agents de conservation bactérienne est ajouté au mélange. Cette préparation est utilisée pour  
15 les études de toxicité suivantes :

**a) Toxicité orale**

Les tests ont été effectués en suivant le protocole en accord avec la ligne directrice de l'OCDE concernant l'étude de la toxicité orale aiguë (n° 401 du 24 février 1987) à des doses maximales de 5 g/kg de poids corporel et n'ont provoqué aucune  
5 lésion macroscopique pouvant être rapportée à un effet toxique du produit.  
La préparation ci-dessus, fabriquée à partir des produits de l'invention, utilisée oralement en dose inférieure à 5 g/kg présente donc une toxicité nulle.

**b) Irritation oculaire**

10 Les tests ont été effectués selon la méthode officielle par l'arrêté du 3 mai 1990 (Journal Officiel de la République Française du 14 novembre 1990) avec la préparation décrite ci-dessus n'ont provoqué aucune lésion de l'iris ou de la cornée.  
La préparation ci-dessus, fabriquée à partir des produits de l'invention, instillée pure est apparue non irritante et la tolérance oculaire peut être considérée comme  
15 très bonne.

**c) Irritation cutanée**

Les tests ont été effectués selon la méthode officielle par l'arrêté du 1<sup>er</sup> février 1982 (Journal Officiel de la République Française du 21 février 1982) avec les  
20 produits de l'invention (exemples I2 et I5) et n'ont provoqué aucun phénomène irritatif.

La préparation ci-dessus, fabriquée à partir des produits de l'invention, instillée pure est apparue non irritante et la tolérance cutanée peut être considérée comme  
excellente.

25

**d) Recherche du pouvoir sensibilisant**

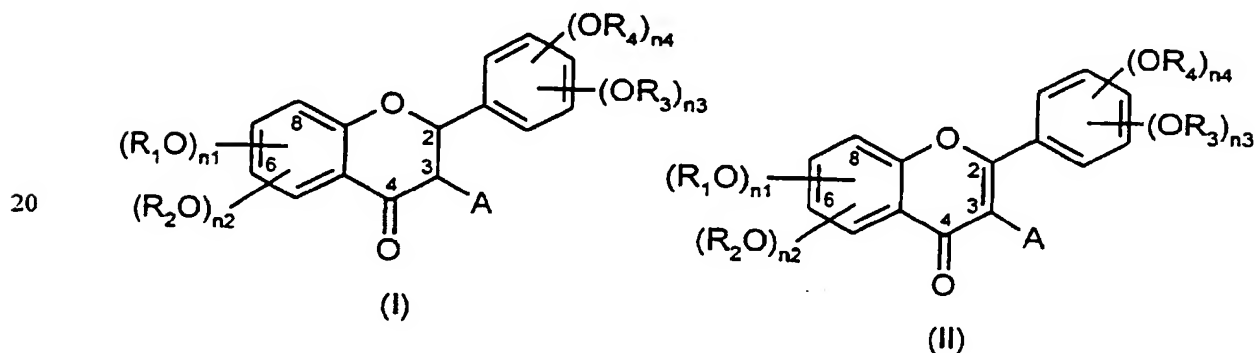
Des tests de maximisation ont été réalisés selon un protocole adapté de la méthode décrite par Magnusson et Kligman (J. INVEST. DERM 1969, 52, 268-276).  
La préparation ci-dessus, fabriquée à partir des produits de l'invention, instillée  
30 pure n'a provoquée aucune réaction macroscopique significative d'une réaction de

sensibilisation. Les produits de l'invention peuvent donc être considérés comme hypo-allergéniques (classe I).

### Revendications

1. Esters de flavonoïdes, caractérisés en ce qu'il s'agit des esters de flavonoïdes résultant du produit de réaction d'au moins un flavonoïde choisi parmi le groupe consistant d'un flavonoïde ayant une fonction cétone en position 4, d'un sel, ester ou éther d'un tel flavonoïde, ou d'un dérivé C-héréroside et/ou O-hétéroside d'un tel flavonoïde, à condition que ce flavonoïde comprenne au moins une fonction alcool libre, avec un monoacide organique ayant de 3 à 30 atomes de carbone.
2. Ester selon la revendication 1, caractérisé en ce que le monoacide organique précité comprend de 4 à 22 atomes de carbone.
3. Ester selon l'une quelconques des revendications précédentes, caractérisé en ce que le flavonoïde précité ayant une fonction cétone en position 4 présente les formules chimiques développées (I) ou (II) suivantes:

15



25 dans laquelle:

- les groupements (OR<sub>1</sub>) à (OR<sub>4</sub>) sont dans une position quelconque du cycle;
- A représente un atome d'hydrogène, un substituant R ou un groupe -OH, ou un groupe -OR, R ayant la même signification que les radicaux R<sub>1</sub> à R<sub>4</sub>;

-  $n_1$ ,  $n_2$  identiques ou différents l'un de l'autre, sont des nombres entiers de 0 à 4, le total de  $n_1 + n_2$  ne pouvant être au plus égal à 4, correspondant au nombre de substitution maximum sur le cycle;

-  $n_3$ ,  $n_4$  identiques ou différents l'un de l'autre, sont des nombres entiers de 0 à 5, le total de  $n_3 + n_4$  étant au maximum égal à 5, représentant le nombre de substitution maximum sur le cycle;

-  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  et  $R_4$  représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène, un groupe alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, en particulier un groupe alkyle inférieur ayant de 1 à 6 atomes de carbone, linéaire, ramifié ou cyclique, saturées ou insaturées, un groupe acyle ayant un radical alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, de préférence de 1 à 8 atomes de carbone, un ose simple ou complexe comportant ou non des fonctions alkyles ou acyles avec des chaînes hydrocarbonées ayant de 1 à 30 atomes de carbone, linéaire ou ramifié ou cyclique, saturées ou insaturées, à condition qu'au moins un des substituants R soit un atome d'hydrogène définissant ainsi au moins une fonction hydroxyle libre;

- et les isomères de ces motifs.

4. Ester selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le flavonoïde de départ est une flavone en particulier de la formule (II) précitée, non-glycosylée, par exemple l'apigénol (ou apigénine) ou le lutéolol, ou une flavone glycosylée, par exemple la diosmine, l'orientine, la saponarine, le shaftoside.

5. Ester selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le flavonoïde de départ est un flavonol en particulier de la formule (II) précitée, non-glycosylé, par exemple le kaempférol, le quercétol (ou quercétine), ou un flavonol glycosylé, par exemple la rutine, le quercitroside, l'hypéroside, l'isoquercitroside, le tiliroside, ou un dihydroflavonol non-glycosylé ou glycosylé, par exemple le dihydrokaempférol et le dihydroquercétol.

6. Ester selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le flavonoïde de départ est une flavanone en particulier de la formule (I) précitée, non-glycosylée, par exemple le naringétol (ou naringénine), l'ériodictyol,

l'hespéritine, l'eucalyptine, la cirsimarine, la cajaflavanone, l'hinokiklavone, l'amentaflavone, le bilobétol, ou une flavanone glycosylée, par exemple hespéridine et naringine.

7. Ester selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le  
5 monoacide organique précité et choisi parmi le groupe consistant de l'acide butyrique (C4:0), de l'acide valérique (C5:0), de l'acide hexanoïque (C6:0), de l'acide sorbique (C6:2); de l'acide ascorbique, de l'acide laurique (C12), de l'acide palmitique (C16:0), de l'acide stéarique (C18:0), de l'acide oléique (C18:1), de l'acide linoléique (C18:2), de l'acide linolénique (C18:3); de l'acide  
10 undécylénique (C11:1), de l'acide heptanoïque (C7:0), de l'acide arachidonique (C20:4), de l'acide éicosa pentanoïque (C20:5), de l'acide docosahexanoïque (C22:6 et C24:1).

8. Ester selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'ose ou  
15 oside substituant le flavonoïde précité est choisi parmi rhamnose, galactose, glucose, arabinose non substitué ou substitué, l'hétéroside étant de préférence choisi parmi tiliroside, orientine, shaftoside, saponarine, rutine, hespéridine, diosmine.

9. Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des  
20 principes actifs au moins un ester de flavonoïde tel que défini dans une quelconque des revendications précédentes.

10. Composition choisie parmi le groupe consistant d'une composition  
cosmétique, d'une composition dermo-pharmaceutique, d'une composition  
pharmaceutique, d'une composition diététique et d'une composition agro-  
alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend comme l'un des principes actifs,  
25 au moins un ester d'un flavonoïde tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans un véhicule, excipient ou support respectivement cosmétiquement, dermatologiquement, pharmaceutiquement acceptable, ou acceptable dans des applications diététiques et agro-alimentaires.

11. Composition selon la revendications 9 ou 10, caractérisée en ce que la  
30 proportion de l'ester de flavonoïde est comprise entre 0,0001% et 10% en poids



par rapport au poids total final de la composition, de préférence entre 0,01% et 5% en poids par rapport au poids final de la composition.

12. Utilisation d'un ester de flavonoïde tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, comme agent cosmétique ou pour la fabrication d'une composition cosmétique, en particulier ayant une activité anti-radicalaire, un effet inhibiteur d'enzyme, une activité anti-couperose, un effet inhibiteur d'érythème chimique, physique ou actinique, permettant de traiter des peaux sensibles, ayant un effet décongestionnant, drainant, amincissant, anti-ride, un effet stimulateur de la synthèse des éléments de la matrice extra-cellulaire, un effet tonifiant, un effet améliorant l'élasticité de la peau, un effet anti-age.

13. Utilisation d'un ester de flavonoïde selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, diététique ou dermo-pharmaceutique, en particulier ayant une activité anti-radicalaire, un effet inhibiteur d'enzyme, un effet veinotonique, un effet d'augmentation de la résistance des capillaires sanguins, un effet anti-couperose, un effet inhibiteur d'érythème chimique, physique ou actinique.

14. Procédé de traitement cosmétique, caractérisé en ce qu'il comprend l'application topique sur la peau d'une personne en ayant besoin, d'une quantité efficace d'au moins un ester de flavonoïde selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

15. Procédé de traitement cosmétique selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un traitement cosmétique anti-couperose, un traitement cosmétique pour inhiber les érythèmes chimiques, physiques ou actiniques, le traitement cosmétique des peaux sensibles, le décongestionnement, le drainage, l'amincissement, un effet anti-ride, un effet stimulateur de la synthèse des éléments de la matrice extra-cellulaire, un effet tonifiant, un effet d'amélioration de l'élasticité de la peau, un effet anti-âge.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 558666  
FR 9806194

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 98 11889 A (EUGSTER CONRAD HANS ;EUGSTER CARL (CH); MARIGEN SA (CH)) 26 mars 1998 * revendications 9-11 *	1-7,9-15
X	EP 0 709 383 A (ADIR) 1 mai 1996 * revendication 1; exemple 53 *	1-7,9-15
X	EP 0 206 219 A (CASSELLA FARBWERKE MAINKUR AG) 30 décembre 1986 * page 33, composé de butyryloxy *	1-7
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8528 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 85-169461 XP002090945 -& JP 60 100570 A (OTSUKA PHARM CO LTD) , 4 juin 1985 * abrégé; exemple 10 *	1-7,9-15
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8107 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D21, AN 81-10549D XP002090946 -& JP 55 157580 A (SANSHO SEIYAKU KK) , 8 décembre 1980 * abrégé *	1-7,9-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07D A61K C07H
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 janvier 1999		De Jong, B
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

6

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 558666  
FR 9806194

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 69, no. 25, 16 décembre 1968 Columbus, Ohio, US; abstract no. 107018, YAMABE, SHIGERU ET AL: "Ester of fatty acid with rutin" XP002090941 * abrégé * & JP 43 011894 A (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.)	1-8
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 7, 17 août 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 66563, MALDONADO, EMMA ET AL: "Acylated flavonols and other constituents from Galeana pratensis" XP002090942 * abrégé * & PHYTOCHEMISTRY (1992), 31(3), 1003-7 ;ISSN: 0031-9422,	1-7
X	DANIELI, BRUNO ET AL: "Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides" HELV. CHIM. ACTA (1990), 73(7), 1837-44 CODEN: HCACAV;ISSN: 0018-019X, XP002090940 * le document en entier * --- -/--	1-8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 janvier 1999		De Jong, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

6

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 558666  
FR 9806194

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 9, 27 août 1990 Columbus, Ohio, US; abstract no. 74850, URZUA, ALEJANDRO ET AL: "Acylated flavonoid aglycons from Gnaphalium robustum" XP002090943 * abrégé * & PHYTOCHEMISTRY (1990), 29(4), 1342-3 , ---	1-7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 3, 16 juillet 1990 Columbus, Ohio, US; abstract no. 24355, DANIELI, BRUNO ET AL: "Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides" XP002090944 * abrégé * & HETEROCYCLES (1989), 29(11), 2061-4 ;ISSN: 0385-5414, ---	1-8
X	EP 0 019 081 A (HOFFMANN LA ROCHE) 26 novembre 1980 * revendication 1; exemples 20,21 * -----	1-7,9-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche 25 janvier 1999		Examineur De Jong, B
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

6

EPO FORM 1503 03 92 (P04C13)